

EP 623629 A1

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI
(c) 2005 Thomson Derwent. All rts. reserv.

010075563 **Image available**

WPI Acc No: 1994-343276/*199443*

XRAM Acc No: C94-156333

**Depolymerised heparin fractions low in nitrous compounds - prep'd. by
nitrous acid depolymerisation and UV treatment.**
Patent Assignee: SANOFI-SYNTHELABO (SNFI); SANOFI SA (SNFI); ELF SANOFI
(SNFI); CHOAY SA (LCHO)

Inventor: BRANELLEC J; ESPEJO J; PICART P; PICARD P

Number of Countries: 034 Number of Patents: 030

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
EP 623629	A1	19941109	EP 94400994	A	19940506	199443 B
AU 9461912	A	19941110	AU 9461912	A	19940505	199445
FR 2704861	A1	19941110	FR 935534	A	19930507	199445
NO 9401686	A	19941108	NO 941686	A	19940506	199503
BR 9401920	A	19941129	BR 941920	A	19940506	199504
FI 9402095	A	19941108	FI 942095	A	19940506	199506
CA 2122930	A	19941108	CA 2122930	A	19940505	199508
CZ 9401132	A3	19941215	CZ 941132	A	19940506	199508
ZA 9403152	A	19950329	ZA 943152	A	19940506	199519
JP 7126302	A	19950516	JP 9495337	A	19940509	199528
CN 1096034	A	19941207	CN 94105382	A	19940507	199548
NZ 260460	A	19960227	NZ 260460	A	19940505	199614
EP 623629	B1	19960821				199638
DE 69400385	E	19960926	DE 94600385	A	19940506	199644
			EP 94400994	A	19940506	
AU 672291	B	19960926	AU 9461912	A	19940505	199646
ES 2093494	T3	19961216	EP 94400994	A	19940506	199707
US 5599801	A	19970204	US 94239320	A	19940506	199711
IL 109587	A	19970415	IL 109587	A	19940506	199726
HU 70553	T	19951030	HU 941446	A	19940506	199732
MX 186561	B	19971022	MX 943413	A	19940509	199901
NO 306952	B1	20000117	NO 941686	A	19940506	200010
RU 2133253	C1	19990720	RU 9415595	A	19940506	200030
CA 2122930	C	20001024	CA 2122930	A	19940505	200059
CZ 287889	B6	20010314	CZ 941132	A	19940506	200117
FI 107388	B1	20010731	FI 942095	A	19940506	200146
TW 438812	A	20010607	TW 94104157	A	19940507	200175
KR 328095	B	20020620	KR 9410033	A	19940507	200280
HU 221595	B1	20021128	HU 941446	A	19940506	200309
JP 3529835	B2	20040524	JP 9495337	A	19940509	200434
CN 1066155	C	20010523	CN 94105382	A	19940507	200501

Priority Applications (No Type Date): FR 935534 A 19930507

Cited Patents: 1.Jnl.Ref; EP 37319; EP 76279; WO 8203627

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

EP 623629 A1 F 14 C08B-037/10

Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU MC

NL PT SE

FR 2704861 A1 24 C07K-007/10

NO 9401686 A C08B-000/00

BR 9401920	A	C08B-037/10
CA 2122930	A	C08B-037/10
CZ 9401132	A3	C08B-037/10
ZA 9403152	A	28 C08B-000/00
JP 7126302	A	10 C08B-037/10
CN 1096034	A	C08B-037/10
NZ 260460	A	C08B-037/10
EP 623629	B1 F 16	

Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU MC

NL PT SE

DE 69400385	E	Based on patent EP 623629
AU 672291	B	Previous Publ. patent AU 9461912
ES 2093494	T3	Based on patent EP 623629
US 5599801	A 10	A61K-031/725
IL 109587	A	C08B-037/10
HU 70553	T	C08B-037/10
MX 186561	B	C08B-037/010
NO 306952	B1	Previous Publ. patent NO 9401686
RU 2133253	C1	C08B-037/10
CA 2122930	C E	C08B-037/10
CZ 287889	B6	C08B-037/10
FI 107388	B1	C08B-037/10
TW 438812	A	A61K-031/715
KR 328095	B	C08B-037/10
HU 221595	B1	C08B-037/10
JP 3529835	B2 10	C08B-037/10
CN 1066155	C	C08B-037/10

Abstract (Basic): EP 623629 A

A heparin fraction obtained by nitrous depolymerisation, having a level of nitrosated compounds at most 500 ppb is new.

MORE SPECIFICALLY - The sodium salt of a heparin depolymerised with nitrous acid, obtained from pig intestinal mucosa, and having the following properties: the major part has a mol. mass of 1700 Da - 3300 Da; 90% has a mol. mass between 1000 Da and 8000 Da; the non-reducing terminal structure is 2-O-sulpho- alpha-L- idopyranosuronic and the reducing terminal structure is 6-O-sulpho-2,5-anhydro-D-mannitol in the major part of the constituents; the degree of sulphation is around 2.1; the Xa anti-factor activity is 60-80 IU/mg; the IIa antifactor is not above 25 IU/mg; the level of nitrosated cpds. is below or equal to 100ppb.

ADVANTAGE - Commercial low molecular weight heparin fractions obtained by nitrous depolymerisation always contain a small quantity of non-volatile nitrosated compounds. Their elimination is now possible on an industrial scale.

Dwg.0/2

Title Terms: DEPOLYMERISE; HEPARIN; FRACTION; LOW; NITROUS; COMPOUND; PREPARATION; NITROUS; ACID; DEPOLYMERISE; ULTRAVIOLET; TREAT

Derwent Class: B04; D15; J01

International Patent Class (Main): A61K-031/715; A61K-031/725; C07K-007/10; C08B-000/00; C08B-037/010; C08B-037/10

International Patent Class (Additional): A61K-031/70; A61K-031/727; A61K-035/407; A61K-037/02; A61P-007/02; C08K-000/00

File Segment: CPI



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



⑪ Numéro de publication : **0 623 629 A1**

⑫

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

⑬ Numéro de dépôt : **94400994.3**

⑮ Int. Cl.⁵ : **C08B 37/10**

⑭ Date de dépôt : **06.05.94**

⑩ Priorité : **07.05.93 FR 9305534**

⑪ Date de publication de la demande :
09.11.94 Bulletin 94/45

⑫ Etats contractants désignés :
**AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU MC
NL PT SE**

⑬ Demandeur : **CHOAY S.A.
32-34 rue Marbeuf
F-75008 Paris (FR)**

⑭ Inventeur : **Banellec, Jean-François
7 Parc de la Saône
F-76130 Mont Saint Aignan (FR)**
Inventeur : **Espejo, José
707 Rue Herbeuse
F-76230 Bois Guillaume (FR)**
Inventeur : **Picart, Philippe
21 Rue Armand Carrel
F-76000 Rouen (FR)**

⑮ Mandataire : **Gillard, Marie-Louise et al
Cabinet Beau de Loménie
158, rue de l'Université
F-75340 Paris Cédex 07 (FR)**

⑯ **Fractions d'héparine purifiées, procédé d'obtention et compositions pharmaceutiques les contenant.**

⑰ **Fractions d'héparine obtenues par dépolymérisation nitreuse, contenant au plus 150 ppb de composés nitrosés totaux, préparées en soumettant des héparines dépolymérisées par un nitrite à l'action du rayonnement UV.**

EP 0 623 629 A1

La présente invention concerne des fractions d'héparine purifiées et plus précisément des fractions d'héparine exemptes de composés nitrosés totaux, un procédé pour leur préparation et des médicaments les contenant.

Plus particulièrement, la présente invention se rapporte à des fractions d'héparine, obtenues par dépolymérisation nitreuse, pratiquement dépourvues de composés nitrosés.

Il est connu que des fractions d'héparine sont obtenues par dépolymérisation nitreuse, comme décrit par exemple dans les demandes de brevets EP-A-0014184 et EP-A-0027089. Certaines fractions d'héparine, préparées par dépolymérisation nitreuse, sont des principes actifs de médicaments qui sont entrés dans l'usage commun sous l'appellation "héparines de bas poids moléculaire" ou "héparines de faible masse moléculaire".

Pour tout détail concernant les héparines de bas poids moléculaire utilisées comme médicaments, leur titrage et leur degré de sulfatation, exprimé par le rapport sulfates/carboxyles, on peut se référer à la publication "Héparines de faible masse moléculaire". Pharmeuropa, Octobre 1991, 3, N. 3, pp. 161-165, ainsi qu'à la monographie proposée pour la Pharmacopée Européenne "Heparina massae molecularis minoris", Février 1993 (PA/PH/Exp. 3T (92) 93). Des héparines de bas poids moléculaire ainsi préparées et utiles comme principes actifs de médicaments sont décrites dans les demandes de brevet ou brevets publiés sous les numéros FR-A-2478646, EP-A-0037319, EP-A-0076279, EP-A-0181259. Elles sont connues sous les Dénominations Communes Internationales (DCI) nadroparine calcique, daltéparine sodique, reviparine sodique et constituent des principes actifs de spécialités commercialisées ou potentielles. Notamment, la reviparine sodique constitue le principe actif de la spécialité CLIVARIN® commercialisée en Allemagne. D'autres héparines de bas poids moléculaire obtenues par dépolymérisation nitreuse sont également présentes dans des spécialités mises à la disposition du corps médical en Allemagne (MONO-EMBOLEX® NM), en Autriche (SANDOPARIN® et TRO-PARIN®), et en Suisse (SANDOPARINE®).

Le procédé de dépolymérisation nitreuse comporte la formation de composés nitrosés non volatils (ci-après également appelés composés N-NO ou tout simplement N-NO) par addition d'un groupe -NO à des composants nitrosables présents dans l'héparine ou dans ses fractions ou fragments. Bien que la quantité de composés nitrosés présents dans les fractions d'héparine soit très faible et ne porte pas de préjudice à leur utilisation en tant que médicaments, puisqu'il s'agit de composés non volatils, la fabrication de ces produits à l'échelle industrielle comporte la manipulation de grandes quantités de poudres. Leur élimination totale ou pratiquement totale pourrait donc apparaître utile pour parfaire les caractéristiques des héparines de bas poids moléculaire qui sont utilisées comme principes actifs de spécialités pharmaceutiques.

Dans le cas d'héparines de bas poids moléculaire dont la masse moléculaire moyenne est faible, par exemple dans le cas d'un produit qui sera dénommé ci-après CY 222 (masse moléculaire moyenne de 1.700 Da à 3.300 Da), la quantité de composés nitrosés peut être supérieure à celle des produits ayant une masse moléculaire plus élevée. Ce produit répond à la définition des produits revendiqués dans les demandes de brevet et brevet publiés sous les numéros FR-2 478 646 et EP-0 037 319, et peut être préparé selon les procédés décrits dans ces mêmes demandes de brevet ou brevet.

Il est donc hautement souhaitable, pour les raisons énoncées ci-dessus, de pouvoir disposer de fractions d'héparine obtenues par dépolymérisation nitreuse et pratiquement dépourvues de composés nitrosés.

Un procédé d'élimination des nitrates dans l'eau potable avec stérilisation simultanée de l'eau, par irradiation aux rayons ultraviolets à une longueur d'onde inférieure à 200 nm, de préférence 185 nm, et à un pH basique est décrit dans l'article P.PRINZ et al., Water Supply, 1988, 6, 199-205. Néanmoins, ce document concernant le traitement de l'eau ne permettait pas de prévoir si une irradiation aux rayons ultraviolets était applicable à un produit biologiquement actif, sans entraîner d'effets néfastes sur ses propriétés biologiques et/ou physicochimiques.

Il a été maintenant trouvé qu'en soumettant une fraction d'héparine obtenue par dépolymérisation nitreuse à l'action des rayons ultraviolets (ci-après désignés simplement UV), on peut éliminer presque totalement les composés nitrosés présents, et on obtient une fraction d'héparine purifiée ayant un taux de composés nitrosés totaux égal voire inférieur à celui de l'héparine naturelle.

Il a été également trouvé que dans les conditions utilisées, le rayonnement UV ne modifie pas la structure des fractions d'héparine, qui conservent toutes leurs propriétés biologiques et physicochimiques.

Ainsi, selon un de ses aspects, la présente invention concerne des fractions d'héparine obtenues par dépolymérisation nitreuse ayant un taux en composés nitrosés totaux inférieur ou égal à 500 parties par billion (ppb), avantageusement inférieur ou égal à 150 ppb, de préférence inférieur ou également à 100 ppb, de préférence encore à 50 ppb, le taux de 50 ppb étant la quantité minimale quantifiable dans l'état actuel des connaissances. Lesdites fractions sont de préférence des héparines de bas poids moléculaire.

Selon un aspect avantageux, l'invention concerne une héparine de bas poids moléculaire purifiée obtenue par dépolymérisation nitreuse, à savoir une héparine dépolymérisée obtenue par dépolymérisation nitreuse d'héparine d'origine naturelle de préférence provenant du mucus intestinal de porc, du poumon de boeuf ou

toute autre héparine extraite des tissus ou des organes d'animaux divers ayant les caractéristiques suivantes :

- une masse moléculaire moyenne inférieure à 8.000 Da,
- au moins 60 % de tous les constituants ont une masse moléculaire inférieure à 8.000 Da,
- activité anti-facteur Xa pas inférieure à 60 UI/mg,
- 5 - rapport activité anti-facteur Xa/anti-facteur IIa pas inférieur à 1,5,
- un taux en composés nitrosés totaux égal ou inférieur à 500 ppb, avantageusement à 150 ppb, de préférence à 100 ppb, de préférence encore à 50 ppb,

ladite héparine dépolymérisée étant sous forme de sel pharmaceutiquement acceptable, de préférence de sodium ou de calcium.

10 L'activité anti facteur Xa et le rapport d'activité anti-facteur Xa/anti-facteur IIa sont évalués par rapport à l'étalement international des héparines de bas poids moléculaire; référence OMS 1-85/600.

La masse moléculaire moyenne ci-dessus est déterminée selon la Monographie proposée pour la Pharmacopée européenne (voir référence ci-dessus).

15 Dans la présente description, on utilise le terme "exempts de composés nitrosés totaux" pour qualifier les fractions d'héparine ou les héparines de bas poids moléculaire obtenues par dépolymérisation nitreuse et contenant au plus 500 ppb, avantageusement au plus 150 ppb, notamment au plus 100 ppb, de préférence au plus 50 ppb de composés nitrosés totaux. Sous le terme "constituants", on désigne l'ensemble des molécules à partir desquelles est constituée l'héparine de bas poids moléculaire.

20 Les héparines de bas poids moléculaire exemptes de composés nitrosés totaux, objet de la présente invention, ont dans la majorité de leurs constituants, une structure 2-O-sulfo- α -L-idopyranosuronique à l'extrémité non réductrice, et une structure 6-O-sulfo-2,5-anhydro-D-mannitol à l'extrémité réductrice et un degré de sulfatation qui ne diffère pas sensiblement de celui de l'héparine d'origine naturelle non fractionnée. Ce degré de sulfatation est compris entre 2 et 2,5, de préférence entre 2,0 et 2,3.

25 Des héparines de bas poids moléculaire, avantageuses selon la présente invention, ont des distributions de masses moléculaires variables, la masse moléculaire de 90% de leurs constituants s'étalant entre 2.000 Da et 10.000 Da, de préférence entre 2.000 Da et 9.000 Da, avantageusement entre 2.000 Da et 8.000 Da. Par ailleurs, ces héparines ont une masse moléculaire majoritaire située entre 3.000 Da et 6.000 Da, de préférence entre 4.000 Da et 5.000 Da.

30 Une autre héparine de bas poids moléculaire préférée selon l'invention a une masse moléculaire majoritaire s'étalant entre 1.700 Da et 3.300 Da, la masse moléculaire de 90 % de tous les constituants s'étalant entre 1.000 Da et 8.000 Da.

35 Sous le terme "masse moléculaire majoritaire", on désigne la masse moléculaire des constituants de l'héparine qui correspondent au sommet du profil chromatographique obtenu par chromatographie d'exclusion, en utilisant un détecteur UV à $\lambda = 205$ nm.

Le CY 222 purifié, défini comme sel de sodium d'une héparine dépolymérisée obtenue par dépolymérisation à l'acide nitreux de l'héparine d'origine naturelle de mucus intestinal de porc ayant :

- une masse moléculaire majoritaire s'étalant entre 1.700 Da et 3.300 Da, 90 % des constituants ayant une masse moléculaire s'étalant entre 1.000 Da et 8.000 Da,
- une structure 2-O-sulfo- α -L-idopyranosuronique à l'extrémité non réductrice et une structure 6-O-sulfo-2,5-anhydro-D-mannitol à l'extrémité réductrice de la majorité de ses constituants,
- 40 - un degré de sulfatation d'environ 2,1,
- une activité anti-facteur Xa de 60-80 UI/mg,
- une activité anti-facteur IIa pas supérieure à 25 UI/mg, plus précisément de 10-15 UI/mg,
- un taux en composés nitrosés totaux inférieur ou égal à 100 ppb ($1 \cdot 10^{-7}$ mg de composés nitrosés par mg de produit), de préférence inférieur ou égal à 50 ppb ($5 \cdot 10^{-8}$ mg de composés nitrosés par mg de produit),

45 représente une fraction d'héparine préférée selon la présente invention.

Les fractions d'héparine exemptes de composés nitrosés totaux (héparines de bas poids moléculaire) de la présente invention, sont préparées selon un autre aspect de la présente invention.

50 Ainsi, la présente invention concerne également un procédé pour la préparation de fractions d'héparine contenant au plus 500 ppb de composés nitrosés totaux, caractérisé en ce qu'on soumet une solution aqueuse d'une fraction d'héparine obtenue par dépolymérisation nitreuse à un rayonnement ultraviolet.

55 Comme produit de départ on peut utiliser toute fraction d'héparine obtenue par dépolymérisation nitreuse. Un tel produit de départ contient en général un taux de composés nitrosés totaux situé entre 1.000 et 20.000 ppb.

La détermination des composés nitrosés totaux est effectuée par la méthode de B. Pignatelli et al., décrite dans Analyst, September 1989, 114, pp. 1103-1108 et dans Analyst, July 1987, 112, pp. 945-949 adaptée à l'héparine et à ses fractions, de préférence aux héparines de bas poids moléculaire.

Le procédé de la présente invention peut être conduit sur une héparine de bas poids moléculaire de qualité pharmaceutique, dissoute dans l'eau, ou bien pendant la fabrication industrielle, après l'étape de dépolymérisation nitreuse et avant l'isolement du produit pur de qualité pharmaceutique. On utilise de préférence une héparine de bas poids moléculaire de qualité pharmaceutique.

5 Ainsi, comme matière première pour le procédé de la présente invention on peut utiliser n'importe quelle héparine de bas poids moléculaire obtenue par dépolymérisation nitreuse. Pour obtenir le maximum d'efficacité du procédé, il est avantageux d'utiliser des solutions d'héparine dépolymérisée exemptes de microparticules en suspension. La présence de ces microparticules peut-être due à une mauvaise dissolution de l'héparine dépolymérisée ou aux différentes impuretés ou encore aux restes de réactifs utilisés lors de la dépolymérisation ou lors de la purification. Les différentes solutions d'héparine dépolymérisée sont donc soumises de manière préférentielle à une filtration préalable.

10 Le procédé de la présente invention est extraordinairement efficace et souple, car il permet l'élimination de composés nitrosés de façon simple, rapide et sûre. En outre, le procédé de l'invention n'entraîne aucune modification dans la structure de la fraction d'héparine, dont les propriétés biologiques et les caractéristiques physicochimiques restent strictement identiques.

15 Le procédé de la présente invention peut être conduit en exposant une solution aqueuse à 5-15% m/V de fraction d'héparine obtenue par dépolymérisation nitreuse, de préférence d'héparine de bas poids moléculaire à purifier, sous un système de rayonnement UV à une longueur d'onde de 180 à 350 nm, de préférence à 254 nm, à une température de 5°C à 50°C, avantageusement de 15°C à 35°C, de préférence à température ambiante.

20 Le pH de la solution est légèrement acide ou légèrement basique, notamment entre 3 et 8, de préférence entre 5 et 8.

25 La durée du rayonnement dépend du système de rayonnement utilisé, de la puissance du rayonnement et de la quantité de composés nitrosés totaux à éliminer, présents dans la fraction d'héparine. Elle est d'environ de 2 à 30 minutes, bien qu'après 9-15 minutes la purification soit en général quasiment complète.

30 Comme système de rayonnement UV, on peut envisager soit un système statique, soit un système dynamique permettant aux solutions de fractions de l'héparine de circuler autour de la source du rayonnement UV. On préfère les systèmes dynamiques. Dans ce dernier cas, la source du rayonnement UV peut être associée à un tube cylindrique (appareil de type "fermé") ou à un canal (appareil de type "ouvert"). Comme appareil de type "fermé", on peut utiliser le stérilisateur UV JR1-50 (KATADYN) ou tout autre appareil équivalent.

35 La Figure 1 représente en coupe un appareil de type "fermé". Cet appareil se compose d'une lampe UV (1) autour de laquelle est adaptée une gaine de quartz (2). Les solutions contenant les héparines de bas poids moléculaire circulent autour de la lampe UV protégée par la gaine de quartz (gaine du liquide circulant (3)). Elles sont introduites par une entrée (4) située au niveau de l'une des extrémités de la lampe UV, la sortie (5) étant située à l'autre extrémité de la lampe UV.

40 Lorsque l'on utilise un système dynamique, le débit des solutions de la fraction d'héparine avec lequel elles circulent autour de la source de rayonnement UV doit être ajusté de manière appropriée, pour obtenir la durée de rayonnement nécessaire pour éliminer les composés nitrosés. Les différents paramètres qui peuvent intervenir sont le diamètre de la veine du liquide circulant, la dimension et/ou la puissance de la source du rayonnement UV, la concentration de la solution aqueuse en fraction d'héparine et la quantité des composés nitrosés à éliminer contenue dans cette fraction.

45 La fraction d'héparine, ou, de préférence, l'héparine de bas poids moléculaire exempte de composés nitrosés totaux ainsi obtenue, peut être récupérée selon les méthodes conventionnelles.

50 Lorsque comme produit de départ on utilise une héparine de bas poids moléculaire déjà de qualité pharmaceutique, il suffit de dissoudre le produit dans l'eau, d'ajuster le pH de la solution entre 3 et 8, de préférence entre 5 et 8 et de soumettre cette solution au procédé de la présente invention.

55 Comme produit de départ on peut également utiliser l'héparine d'origine naturelle non fractionnée, avantageusement sous la forme de sel, notamment l'héparine sodique, de préférence provenant du mucus intestinal de porc. Dans ce cas, le procédé de la présente invention constitue une étape dans la préparation du produit final purifié exempt de composés nitrosés totaux, après la dépolymérisation nitreuse. Le procédé global partant de l'héparine, représente un objet ultérieur de la présente invention.

Ainsi, selon un autre de ses aspects, la présente invention concerne un procédé pour la préparation, par dépolymérisation nitreuse, d'une héparine de bas poids moléculaire ayant un taux en composés nitrosés totaux inférieur ou égal à 500 ppb, avantageusement inférieur ou égal à 150 ppb, de préférence inférieur ou égal à 100 ppb, de préférence encore inférieur ou égal à 50 ppb, caractérisé en ce que :

(a) on traite une solution d'héparine sodique non fractionnée dans l'eau à 5-15 % m/V avec une solution d'un nitrite alcalin, de préférence le nitrite de sodium à raison de 15 à 69 g de nitrite par kg d'héparine mise en oeuvre, en présence d'acide chlorhydrique à un pH de 1 à 5, de préférence 1,5 à 4, pendant une

durée de 20 à 50 minutes et on soumet le produit ainsi obtenu à une réduction, de préférence en milieu alcalin, avec 5-20 g de borohydrure de sodium par kg d'héparine de départ, on détruit l'excès de borohydrure de sodium par de l'acide chlorhydrique, on neutralise éventuellement le milieu réactionnel, et on précipite à l'éthanol, puis après avoir éventuellement soumis l'héparine de bas poids moléculaire ainsi obtenue à un ou plusieurs fractionnements alcooliques,

- 5 (b) on soumet la solution ainsi obtenue à un rayonnement ultraviolet,
- (c) on procède éventuellement à une purification chromatographique et on isole l'héparine sodique dépolymérisée, purifiée et exempte de composés nitrosés totaux par précipitation avec du chlorure de sodium et de l'éthanol, et, éventuellement,
- 10 (d) on transforme le sel de sodium en un autre sel pharmaceutiquement acceptable, le sel de calcium de préférence.

Selon un aspect préféré, la présente invention concerne un procédé pour la préparation du CY 222 purifié, défini comme sel de sodium d'une héparine dépolymérisée obtenue par dépolymérisation à l'acide nitreux de l'héparine d'origine naturelle de mucus intestinal de porc ayant :

- 15 - une masse moléculaire majoritaire s'étalant entre 1.700 Da et 3.300 Da,
- 90 % des constituants ayant une masse moléculaire s'étalant entre 1.000 Da et 8.000 Da,
- une structure 2-O-sulfo- α -L-idopyranosuronique à l'extrémité non réductrice et une structure 6-O-sulfo-2,5-anhydro-D-mannitol à l'extrémité réductrice de la majorité de ses constituants,
- un degré de sulfatation d'environ 2,1,
- 20 - une activité anti-facteur Xa de 60-80 UI/mg,
- une activité anti-facteur IIa pas supérieure à 25 UI/mg,
- un contenu en composés nitrosés inférieur ou égal à 100 ppb, de préférence inférieur ou égal à 50 ppb,

ledit procédé étant caractérisé en ce que :

- 25 (a) on traite une solution aqueuse d'héparine sodique d'origine naturelle non fractionnée avec de l'acide chlorhydrique et une quantité d'un nitrite alcalin de 3,5 à 4% en poids par rapport à l'héparine mise en œuvre, tout en maintenant le pH acide et en surveillant la présence d'ions nitreux jusqu'à réaction négative, puis on alcalinise, on réduit avec du borohydrure de sodium et on isole en milieu neutre le produit dépolymérisé par précipitation par l'éthanol, puis,
- (b) on fait passer une solution aqueuse du produit ainsi obtenu, à pH d'environ 7, sous un système à rayonnement ultraviolet à 254 nm, on introduit ensuite la solution ainsi obtenue au sommet d'une colonne échangeuse d'anions et, après rinçage de la colonne à l'eau et à pH d'environ 7, on récupère le produit final par précipitation avec du chlorure de sodium et d'éthanol.

A l'étape (a), on utilise dans les proportions décrites ci-dessus comme nitrite alcalin, le nitrite de sodium.

De préférence, dans l'étape (b) du procédé le système à rayonnement ultraviolet est muni d'une lampe de 35 16 W et la durée de l'exposition au rayonnement UV à 254 nm est de 9-15 minutes environ. On préfère un système de rayonnement UV dynamique et notamment un appareil de type "fermé". D'une manière avantageuse, la concentration des solutions soumises au rayonnement UV, est de 8-12 % m/V.

Selon un aspect ultérieur, la présente invention concerne des compositions pharmaceutiques contenant, en tant que principe actif, une fraction d'héparine purifiée, exempte de composés nitrosés totaux, de préférence une héparine de bas poids moléculaire purifiée, exempte de composés nitrosés totaux, telle que décrite ci-dessus.

Pour les compositions selon la présente invention, la fraction d'héparine peut se présenter sous forme de lyophilisat ou en solution pour l'injection sous-cutanée, dans un solvant biologiquement acceptable stérile tel que l'eau ou dans une solution physiologique, dans des ampoules, dans des flacons, dans des seringues pré-remplies ou dans des dispositifs pour auto-injection du type "stylo". Chaque unité de compositions pharmaceutiques de dosage peut contenir de 50 à 50.000 UI anti-facteur Xa.

Les fractions d'héparine selon l'invention peuvent également être administrées par injection intraveineuse, seules ou en mélange avec d'autres principes actifs. Elles peuvent être encore administrées par nébulisation intranasale ou intrapulmonaire.

50 Une composition pharmaceutique préférée selon la présente invention contient, comme principe actif, le CY 222 exempt de composés nitrosés totaux, tel que décrit ci-dessus dans des unités de dosage contenant de 10 mg à 5000 mg de CY 222 sous forme de sel de sodium.

Comme il a été indiqué précédemment, la détermination des composés nitrosés totaux est effectuée par la méthode de B. Pignatelli et al, décrite dans Analyst, September 1979, 114, pp. 1103-1108 et dans Analyst, July 1987, 112, pp. 945-949, adaptée à l'héparine et aux héparines de bas poids moléculaire.

Méthode analytique

Les produits à analyser sont de préférence en poudre, par conséquent, en cas de détermination des composés nitrosés totaux présents dans une solution, on procède d'abord à une lyophilisation de ladite solution et on analyse après l'échantillon lyophilisé.

1- Réactifs

- Les réactifs utilisés pour 100 mg de fraction d'héparine sont les suivants :
- Acétate d'éthyle traité à l'acide sulfamique 20% m/V, (une solution de 200 g d'acide sulfamique dans 1000 ml d'acétate d'éthyle agitée pendant 3 jours et filtrée sur papier avant utilisation),
 - Acide bromhydrique à 15% dans l'acide acétique, (petits flacons ambrés avec bouchon en polyéthylène, contenant 5 ml d'acide bromhydrique à 30%, fermés sous argon et conservés à l'obscurité. Au moment de l'emploi on ajoute 5 ml d'acide acétique pur, on agite et on conserve dans un petit contenant à l'obscurité. On utilise 1 flacon par série de dosages),
 - Formamide à 95% traité à l'acide sulfamique 5% m/V, (une solution de 1 g d'acide sulfamique dans 20 ml de formamide contenant 5% d'eau purifiée).

2- Préparation des solutions étalons et de l'échantillon à analyser

- Solution étalon de N-nitroso di-n-propylamine (NDPA)
On injecte 78,62 g d'éthanol pur dans un flacon ISOPAC Sigma, contenant 1 g de N-nitroso di-n-propylamine, à travers le septum. La concentration est de 10000 ppm de NDPA (3379 ppm de N-NO). Puis on dilue au 1/100ème avec de l'éthanol pur et on aliquote en 0,5 ml dans des petits flacons capsulés. La concentration est de 100 ppm de NDPA. On conserve à l'obscurité et à +4°C.
 - *Solution étalon bas* : au moment de l'emploi on fait une dilution au 1/100ème dans l'éthanol puis au 1/17ème dans le formamide traité. La concentration sera de 0,0588 ppm de NDPA ou 19,9 ppb de N-NO.
 - *Solution étalon moyen* : au moment de l'emploi on fait une dilution au 1/61ème dans l'éthanol puis au 1/11ème dans le formamide traité. La concentration sera de 0,149 ppm de NDPA ou 50,4 ppb de N-NO.
 - *Solution étalon haut* : au moment de l'emploi on fait une dilution au 1/10ème dans l'éthanol puis au 1/10ème dans le formamide traité. La concentration sera de 1 ppm de NDPA ou 338 ppb de N-NO.
- Echantillon à analyser
On sèche les échantillons de fraction d'héparine 12 heures à 60°C sous vide, sous anhydride phosphorique.
- On dissout 100 mg de fraction d'héparine dans 1 ml de formamide traité et on agite 30 minutes sur un agitateur-secoueur.

3- Appareillage utilisé

- 40 L'appareillage utilisé est illustré dans la Figure 2.

Montage

L'appareil se compose d'un ballon de 500 ml en pyrex (1) surmonté d'un réfrigérant à double effet (2) refroidi à -15°C. Celui-ci est relié à trois barboteurs montés en série (3) contenant chacun 30 ml d'hydroxyde de sodium à 30%. Ces derniers sont reliés à deux pièges à froid montés en série, l'un préparé avec de l'éthanol en fusion à -120°C (4) et l'autre avec de l'isopentane en fusion à -160°C (5). Ceux-ci sont reliés, enfin, à un détecteur à chimiluminescence (TEA) Model 610 (Thermedics Detection INC.) ou équivalent (6). Le détecteur est relié à un intégrateur/enregistreur (7).

Le ballon est équipé d'un côté, d'un bouchon percé (8) permettant d'introduire une canule par laquelle arrive un flux d'argon, et de l'autre côté, d'un rodage à vis muni d'un bouchon permettant de fixer un septum type CPG (9) par lequel on injecte l'échantillon. C'est le flux d'argon et le vide produit par la pompe à vide du TEA qui entraînent les gaz vers le TEA.

4- Protocole opératoire4.1- Réglage du détecteur

Le TEA est réglé selon les instructions du fabricant afin d'obtenir la sensibilité et la reproductibilité maximales. Une heure avant le dosage, on ouvre l'oxygène, pression 2 bars, on règle le débit à 0,02 sur le débitmètre du TEA 610 (Thermedics Detection INC.).

4.2- Préparation des pièges à soude

On remplit chaque piège avec 30 ml d'hydroxyde de sodium à 30%.

4.3- Préparation des pièges à froid

5 *Piège à -120°C* : Dans un Dewar contenant 250 ml d'éthanol, on verse doucement, en agitant à l'aide d'une spatule de bois, de l'azote liquide jusqu'à l'obtention d'une pâte.

Piège à -160°C : Dans un Dewar contenant 250 ml d'isopentane, on verse doucement, en agitant à l'aide d'une spatule de bois, de l'azote liquide jusqu'à l'obtention d'une pâte.

Les deux pièges en verre sont placés dans leurs Dewars respectifs et branchés en série sur le circuit.

4.4- Déshydratation de l'ensemble ballon-réfrigérant

10 On met à reflux 50 ml d'acétate d'éthyle pendant 1 heure, sous argon, sans brancher au TEA.

4.5- Réaction et dosage

15 Dans un nouveau ballon propre et sec, équipé d'un septum, on introduit 30 ml d'acétate d'éthyle traité, on monte celui-ci sous le réfrigérant (le cryostat doit être mis en route 2 heures avant à -15°C), on place le chauffe-ballon et met en chauffe (position 4). On branche la canule d'argon, règle le débit à 0,1 l/minute et vérifie l'étanchéité de tout le circuit. Seul le branchement sur le TEA reste ouvert pour éviter une surpression. Lorsque l'acétate d'éthyle est à reflux, on passe sous vide très doucement et en même temps on resserre l'arrivée sur le TEA. Le vide se fait dans tout le circuit et atteint 2-4 mm de Hg lorsque le système est équilibré. On règle le zéro du TEA à 10% pleine échelle de l'intégrateur/enregistreur.

A travers le septum, on injecte successivement 0,5 ml d'eau purifiée, 2 ml d'acide bromhydrique dilué puis

20 à nouveau 2 ml d'acide bromhydrique dilué, entre chaque injection on vérifie le retour en ligne de base sur l'intégrateur/enregistreur. Une fois les réactifs injectés dans le ballon, on attend le retour en ligne de base et injecte 50 µl d'étaillon ou d'échantillon. Entre chaque injection, on attend le retour en ligne de base. Lors des dosages, on encadre 5 échantillons par 2 étalons et on procède de façon à ce que la manipulation complète ne dure pas plus de 60 minutes.

25 4.6- Evaluation de la quantité des composés nitrosés totaux La quantité de N-NO, en ppb, est calculée par la formule :

$$\text{ppb en N-NO} = \frac{\text{surface échantillon} \times \text{Cs} \times 0,05 \times 44 \times 1000}{\text{surface étalon} \times 0,05 \times 0,1 \times 130,2}$$

où

30 - Cs : concentration de l'étaillon en ppm de NDPA (0,0588 ou 0,149 ou 1 ppm)

- 0,05 : (numérateur) prise d'essai de l'étaillon (ml)

- 44 : masse moléculaire de N-NO

- 1000 : conversion ppm en ppb

- 0,05 : (dénominateur) prise essai de l'échantillon (ml)

35 - 0,1 : prise essai d'échantillon en grammes

- 130,2 : masse moléculaire du NDPA.

Les exemples suivants illustrent l'invention.

EXEMPLE 1

40 **Préparation de la nadroparine calcique purifiée ayant une teneur en dérivés nitrosés totaux inférieure à 100 ppb**

Stade A : Dépolymérisation et fractionnement éthanolique

Dans un réacteur on dissout 20 kg d'héparine sodique provenant de mucus intestinal de porc avec de l'eau purifiée de façon à obtenir une concentration finale voisine de 10,3 % (m/V). On ajuste le pH de la solution à 2,5 au moyen d'acide chlorhydrique concentré.

45 On introduit 572 g de nitrite de sodium dans le réacteur en maintenant le pH à 2,5 au moyen d'acide chlorhydrique concentré.

50 On suit la réaction de dépolymérisation à l'aide du papier test à l'iode de potassium amidonné. La réaction est terminée lorsque le test est négatif. On ajuste le pH de la solution réactionnelle à 10 avec de l'hydroxyde de sodium concentré, puis on ajoute 200 g de borohydrure de sodium. On agite pendant 15 heures puis on ajuste le pH entre 4 et 3,5 à l'aide d'acide chlorhydrique concentré, afin de détruire l'excès de borohydrure. Puis on ajuste le pH à 7 par addition d'hydroxyde de sodium concentré. On précipite ensuite en ajoutant 2 volumes d'éthanol par volume de solution aqueuse. On laisse décanter puis on élimine le surageant hydroalcoolique. On dissout le précipité dans 400 l d'eau purifiée. On ajoute à cette solution du chlorure de sodium jusqu'à l'obtention d'une conductivité voisine de 20000 µS/cm. On ajuste ensuite le pH à une valeur voisine de 4 avec de l'acide chlorhydrique concentré et on ajoute à la solution sous agitation 1 volume d'éthanol absolu. On laisse décanter pendant 60 heures environ, puis on élimine le sur-

5 nageant hydroalcoolique. On obtient ainsi la nadroparine sous forme de sel de sodium. On dissout ensuite le précipité dans l'eau purifiée de façon à obtenir une solution à environ 18 % m/V sur la base de la quantité d'héparine sodique engagée au départ, on ajuste le pH à 7 à l'aide d'hydroxyde de sodium concentré. On filtre ensuite la solution sur un système équipé de cartouches filtrantes de porosité de 0,2 µm. On prélève de la solution filtrée contenant la nadroparine sodique un échantillon qui ne sera pas traité selon le procédé décrit au stade B (traitement par le rayonnement UV). Cet échantillon est appelé "Témoin".

10 **Stade B : Traitement par le rayonnement UV**

Pour le traitement par le rayonnement UV, on utilise un tube Katadyn de type JR1-50 de volume utile de 750 ml. La longueur d'onde utilisée est de 254 nm. On règle préalablement à l'aide d'une pompe péristaltique le débit de passage en utilisant de l'eau purifiée, de manière adéquate (4800 ml/heure) pour obtenir par un passage sans recyclage un temps d'exposition total aux UV d'environ 9 minutes. On introduit ensuite la solution de nadroparine sodique à traiter et on lave le circuit avec de l'eau purifiée jusqu'à récupération complète du produit traité dans la cuve qui est adaptée à la sortie du tube Katadyn JR1-50.

15 **Stade C : Purification par chromatographie et transformation en sel calcique**

On purifie la solution de nadroparine obtenue au stade précédent sur colonne anionique (0,5 l/kg d'héparine sodique mis en oeuvre). On ajuste la conductivité des effluents collectés à 10000-20000 µS/cm avec du chlorure de sodium et on ajoute ensuite 1,5 volume d'éthanol. On laisse décanter environ 41 heures puis on élimine le surnageant.

20 On dissout le précipité dans de l'eau purifiée ($C = 18 \% \text{ m/V}$ sur la base de la quantité d'héparine sodique mise en oeuvre) et on ajoute du chlorure de calcium hexahydraté (9,63 g/g d'héparine sodique engagé). On procède ensuite à une précipitation éthanolique en ajoutant 1,5 volume d'éthanol. On répète l'étape de salification par le chlorure de calcium hexahydraté et l'étape de purification par précipitation éthanolique. Le précipité obtenu est séché à une température ne dépassant pas 60°C.

25 On obtient ainsi le lot 1.

Le lot "témoin" obtenu au Stade A est traité aussi selon le procédé décrit dans ce Stade C et on isole le lot "témoin" de nadroparine calcique.

Sur un échantillon du lot 1 et du lot "témoin" de nadroparine calcique, on effectue des analyses physico-chimiques et des dosages pour déterminer leur activité biologique.

30 Les différents résultats sont donnés dans les tableaux I et II.

35

40

45

50

55

TABLEAU I

Essais physicochimiques		
NATURE DU CONTROLE	LOT 1 (TRAITEMENT PAR UV)	TEMOIN (SANS TRAITEMENT UV)
Composés nitrosés totaux	53 ppb	3150 ppb
Sulfates libres	0,05 %	0,06 %
pH solution à 5 %	6,0	6,0
NH ₂ libres	< 30 ppm	< 30 ppm
HPLC-GPC (UV 205 nm)		
Massé moléculaire moyenne en poids (Mw)	5017 Da	4933 Da
Massé moléculaire moyenne en nombre (Mn)	4043 Da	4052 Da
Poids moléculaire au sommet	4181 Da	4192 Da
Dispersion	1,24	1,21
% PM > 10000 Da	2,4	2,1
% PM > 8000 Da	7,2	6,9
% PM < 2000 Da	3,0	2,9
% PM < 1800 Da	2,4	2,3

TABLEAU II

Essais biologiques		
NATURE DU CONTROLE	LOT 1 (TRAITEMENT PAR UV)	TEMOIN (SANS TRAITEMENT UV)
Activité anti-facteur Xa	124 UI/mg	123 UI/mg
Activité anti-facteur IIa	29,3 UI/mg	30,4 UI/mg

Les résultats indiqués dans les tableaux I et II démontrent que le traitement par UV ne provoque aucune altération de la nadroparine. En effet les différentes caractéristiques physicochimiques et biologiques du lot 1 tels que le profil chromatographique du produit, le taux des différentes impuretés, l'activité anti-facteur Xa et l'activité anti-facteur IIa sont identiques à celles du témoin non traité par le rayonnement UV à une seule exception. Le taux des composés nitrosés totaux du témoin non traité est environ 60 fois supérieur à celui des composés nitrosés totaux du lot 1 qui a subit un traitement par le rayonnement UV.

Par ailleurs, les résultats d'analyses par résonance paramagnétique électronique ont confirmé que le traitement par le rayonnement UV ne provoque pas la libération de radicaux libres.

EXEMPLE 2

Préparation du CY 222 sel de sodium ayant un taux de composés nitrosés totaux inférieur à 50 ppb

Stade A : Dépolymérisation

Dans un réacteur, on dissout 250 g d'héparine sodique provenant de mucus intestinal de porc avec de l'eau purifiée, de façon à obtenir une concentration finale voisine de 10,3 % (m/V). On ajuste le pH à 2,5 au moyen d'acide chlorhydrique concentré. On introduit 9,49 g de nitrite de sodium dans le réacteur en maintenant le pH à 2,5. On suit la réaction de dépolymérisation à l'aide du papier test à l'iodure de potassium

5 amidonné. La réaction est terminée lorsque le test est négatif. On ajuste le pH de la solution réactionnelle entre 10 et 10,5 avec de l'hydroxyde de sodium concentré puis, on ajoute 2,5 g de borohydre de sodium. On laisse le mélange sous agitation pendant 15 heures, puis on ajuste le pH entre 3,5 et 4 à l'aide d'acide chlorhydrique concentré afin de détruire l'excès de borohydre. On ajuste le pH à 7 par addition d'hydroxyde de sodium concentré. On précipite ensuite en ajoutant 2 volumes d'éthanol par volume de solution. On laisse décanter le précipité et on élimine le surnageant. On obtient ainsi le CY 222 sous forme de sel de sodium. Le produit ainsi obtenu contient entre 3.000 et 10.000 ppb de composés nitrosés totaux (Résultats de 3 préparations).

10 **Stade B : Traitement par le rayonnement UV**

15 On dissout le précipité de l'étape précédente dans de l'eau purifiée de façon à obtenir une solution finale à environ 10 % m/V sur la base de la quantité d'héparine sodique engagée, on ajuste le pH à 7 par de l'acide chlorhydrique ou de l'hydroxyde de sodium. Après avoir réglé le débit de la pompe, on fait passer la solution ainsi obtenue, sous un système à rayonnement ultraviolet à 254 nm (système Katadyn JR1-50 muni d'une lampe de 16 W). La durée de l'exposition au rayonnement UV est de 9 à 15 minutes.

20 **Stade C : Purification par chromatographie et précipitations finales**

25 On purifie la solution obtenue après traitement par rayonnement UV sur une colonne chromatographique contenant au minimum 2 litres de résine anionique par kg d'héparine sodique engagé. On ajuste la conductivité des effluents collectés à 30-35 mS/cm à l'aide de chlorure de sodium et on ajuste leur pH à 7 à l'aide d'acide chlorhydrique. Puis, on ajoute 2 volumes d'éthanol par volume de solution aqueuse. On laisse décanter le précipité et on élimine le surnageant. On dissout le précipité dans l'eau purifiée de façon à obtenir une solution finale à 20 % m/V sur la base de la quantité d'héparine sodique engagée au départ, on ajuste la conductivité de la solution à 30-35 mS/cm avec du chlorure de sodium et le pH entre 7-7,5 à l'aide de l'acide chlorhydrique concentré ou de l'hydroxyde de sodium concentré. On précipite ensuite la solution par 2 volumes d'éthanol absolu et on laisse décanter. On recueille le précipité, on le lave à l'éthanol et on le sèche à une température ne dépassant pas 60°C. On obtient ainsi le CY 222 pur, défini comme sel de sodium d'une héparine dépolymérisée obtenue par dépolymérisation à l'acide nitreux de l'héparine de mucus intestinale de porc ayant :

- 30 - une masse moléculaire majoritaire s'étageant entre 1.700 Da et 3.300 Da, 90% des constituants s'étageant entre 1.000 Da et 8.000 Da,
 - une structure 2-O-sulfo- α -L-Idopyranosuronique à l'extrémité non réductrice et une structure 6-O-sulfo-2,5-anhydro-D-mannitol à l'extrémité réductrice de la majorité de ses constituants,
 - un degré de sulfatation d'environ 2,1,
 - une activité anti-facteur Xa de 60-80 UI/mg,
 - une activité anti-facteur IIa pas supérieure à 25 UI/mg et notamment de 10-15 UI/mg,
 - un contenu en composés nitrosés inférieur à 50 ppb.

40 **Revendications**

- 45 1- Fraction d'héparine obtenue par dépolymérisation nitreuse ayant un taux en composés nitrosés totaux inférieur ou égal à 500 ppb.
 2- Fraction d'héparine selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est une héparine de bas poids moléculaire .
 3- Héparine de bas poids moléculaire selon la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle est une héparine dépolymérisée, obtenue par dépolymérisation nitreuse d'héparine d'origine naturelle provenant de mucus intestinal de porc, du poumon de boeuf ou toute autre héparine extraite des tissus ou des organes d'animaux divers ayant les caractéristiques suivantes :
 - une masse moléculaire moyenne inférieure à 8.000 Da,
 - au moins 60 % de tous les constituants ont une masse moléculaire moyenne inférieure à 8.000 Da,
 - une activité anti-facteur Xa pas inférieure à 60 UI/mg,
 - un rapport activité anti-facteur Xa/anti-facteur IIa pas inférieur à 1,5 sous forme de sel pharmaceutiquement acceptable.
 4- Héparine de bas poids moléculaire selon la revendication 3, sous forme de sel de sodium ou de sel de calcium.
 5- Sel de sodium d'une héparine dépolymérisée obtenue par dépolymérisation à l'acide nitreux de l'héparine d'origine naturelle de mucus intestinal de porc ayant :
 - une masse moléculaire majoritaire s'étalant entre 1.700 Da et 3.300 Da,

- 90 % des constituants ayant une masse moléculaire s'étalant entre 1.000 Da et 8.000 Da,
- une structure 2-O-sufo- α -L-idopyranosuronique à l'extrémité non réductrice et une structure 6-O-sufo-2,5-anhydro-D-mannitol à l'extrémité réductrice de la majorité de ses constituants,
- un degré de sulfatation d'environ 2,1,
- 5 - une activité anti-facteur Xa de 60-80 UI/mg,
- une activité anti-facteur IIa pas supérieure à 25 UI/mg,
- un taux en composés nitrosés totaux inférieur ou égal à 100 ppb.
- 6. Sel de sodium d'une héparine dépolymérisée selon la revendication 5, caractérisé en ce que le taux en composés nitrosés totaux est inférieur ou égal à 50 ppb.
- 10 7- Procédé pour la préparation d'une fraction d'héparine selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'on soumet une solution aqueuse d'une fraction d'héparine obtenue par dépolymérisation nitreuse à un rayonnement ultraviolet.
- 15 8- Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'on expose une solution aqueuse d'une fraction d'héparine obtenue par dépolymérisation nitreuse de concentration de 5-15 % m/V, sous un système à rayonnement ultraviolet à une longueur d'onde de 180 à 350 nm, à une température comprise entre 5°C et 50°C, le pH de la solution étant entre 3 et 8.
- 9- Procédé selon l'une des revendications 7 ou 8, caractérisé en ce qu'on opère à 254 nm, à une température comprise entre 15°C et 35°C et à un pH entre 5 et 8.
- 20 10-Procédé pour la préparation d'une héparine de bas poids moléculaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que :
 - (a) on traite une solution d'héparine sodique non fractionnée dans l'eau à 5-15 % m/V avec une solution de nitrite de sodium, à raison de 15 à 69 g de nitrite par kg d'héparine mise en oeuvre, en présence d'acide chlorhydrique à un pH de 1 à 5, de préférence 1,5 à 4, pour une durée de 20 à 50 minutes et on soumet le produit ainsi obtenu à une réduction, de préférence en milieu alcalin, avec 5-20 g de borohydrure de sodium par kg d'héparine mise en oeuvre au départ, on détruit l'excès de borohydrure de sodium par l'acide chlorhydrique, on neutralise éventuellement le milieu réactionnel, et on précipite à l'éthanol, puis après avoir éventuellement soumis l'héparine de bas poids moléculaire ainsi obtenue à un ou plusieurs fractionnements alcooliques,
 - 25 (b) on soumet la solution ainsi obtenue à un rayonnement ultraviolet,
 - (c) on procède éventuellement à une purification chromatographique et on isole l'héparine sodique dépolymérisée, purifiée et exempte de composés nitrosés totaux par précipitation avec du chlorure de sodium et de l'éthanol, et, éventuellement,
 - (d) non transforme le sel de sodium en un autre sel pharmaceutiquement acceptable.
- 30 11-Procédé pour la préparation du produit selon la revendication 6, caractérisé en ce que :
 - (a) on traite une solution aqueuse d'héparine sodique non fractionnée avec de l'acide chlorhydrique et une quantité d'un nitrite alcalin de 3,5 à 4 % en poids par rapport à l'héparine mise en oeuvre, tout en maintenant le pH acide et en surveillant la présence d'ions nitreux jusqu'à réaction négative, puis on alcalinise, on réduit avec du borohydrure de sodium et on isole en milieu neutre le produit dépolymérisé par précipitation par l'éthanol, puis,
 - 35 (b) on fait passer une solution aqueuse du produit ainsi obtenu, à pH d'environ 7, sous un système à rayonnement ultraviolet à 254 nm, on introduit ensuite la solution ainsi obtenue au sommet d'une colonne échangeuse d'anions et, après rinçage de la colonne à l'eau et à pH d'environ 7, on récupère le produit final par précipitation avec du chlorure de sodium et d'éthanol.
- 40 12-Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que dans l'étape (b), on utilise un système à rayonnement ultraviolet à 254 nm pendant 9 à 15 minutes avec une lampe UV de 16 W, la concentration de la solution du produit soumis au rayonnement UV étant de 8-12 % m/V.
- 45 13-Composition pharmaceutique contenant, en tant que principe actif, une fraction d'héparine selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.
- 50 14-Composition pharmaceutique contenant comme principe actif, 10 mg à 5.000 mg du produit selon la revendication 6, par unité de dosage.

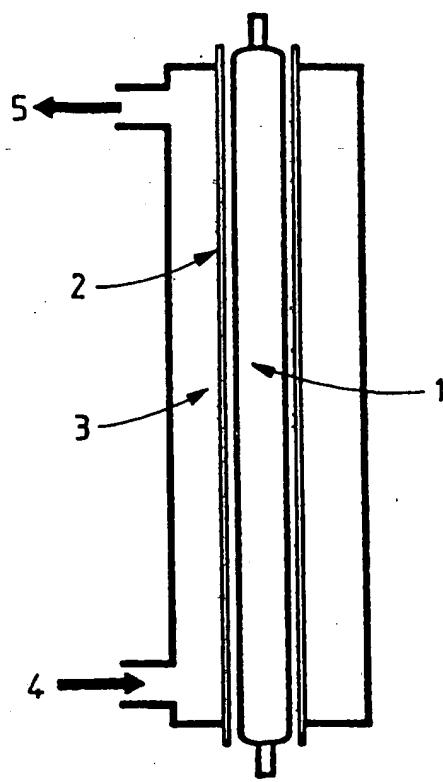


FIG.1

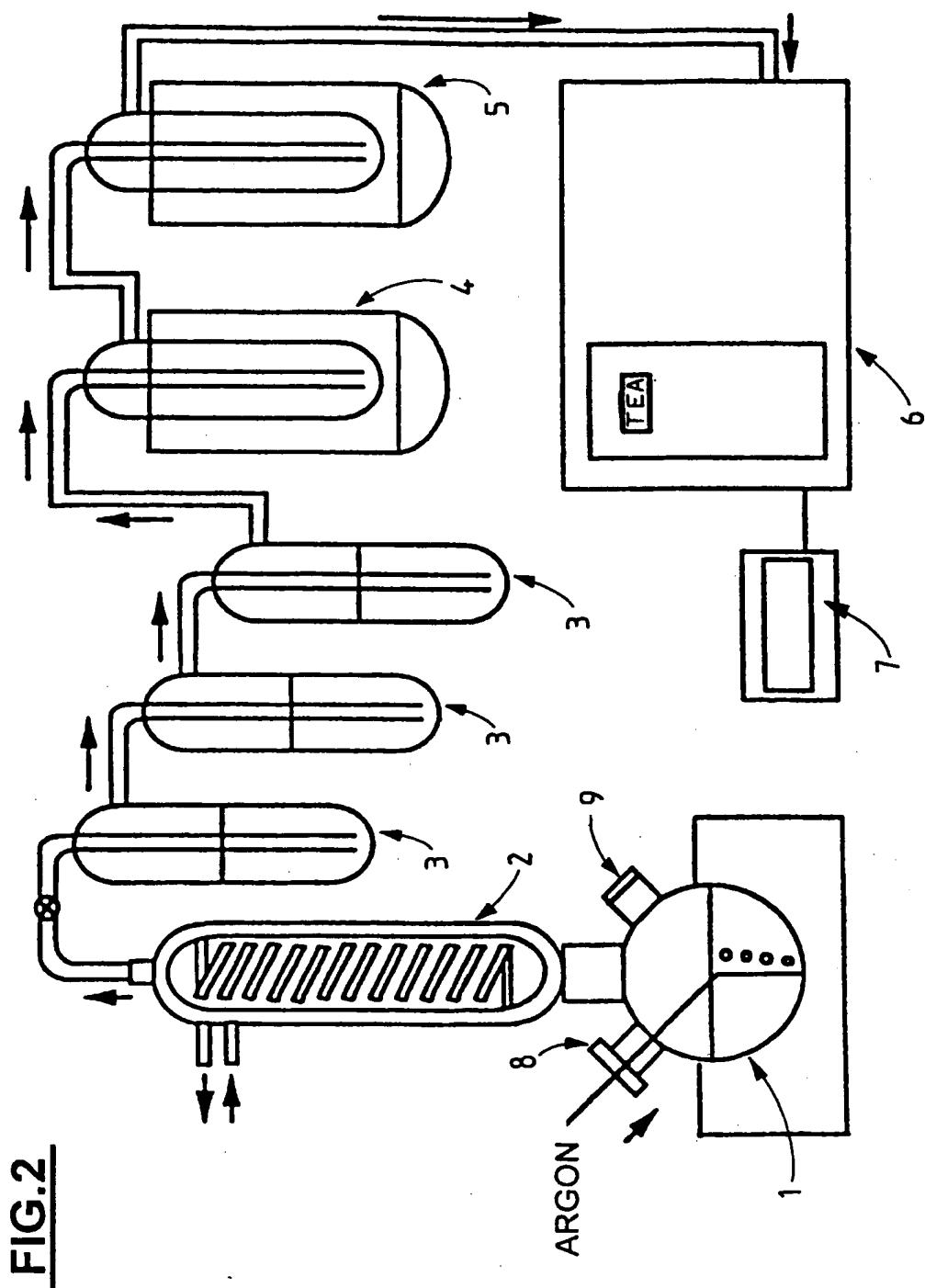


FIG.2



DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.CS)
A	WO-A-82 03627 (CHOAY S.A.) * page 2, ligne 1 - ligne 8 * * revendications; exemples 1-3 * & EP-A-0 076 279 (CHOAY S.A.) ----	1-6,13, 14	C08B37/10
D,A	WATER SUPPLY vol. 6 , 1988 , GB pages 199 - 205 P. PRINCE ET AL. 'Photochemical nitrate removal from drinking water' * abrégé *	7-9	
D,A	EP-A-0 037 319 (CHOAY) ----		
DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CS)			
C08B C08K			
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
lieu de la recherche LA HAYE	Date d'achèvement de la recherche 12 Août 1994	Examinateur Mazet, J-F	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinents à lui seul Y : particulièrement pertinents en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrête-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			